Chirurgia Polska 2002, 4, 3, 117–124
ISSN 1507–5524
Copyright © 2002 by Via Medica

Ocena właściwości mechanicznych tętnic ludzkich poddanych procesowi wyjałowienia oraz kontrolowanego zamrażania przy wykorzystaniu krioprotektora

Assessment of the mechanical proprieties of human allogenic arteries after antibiotic sterilisation and cryopreservation

Tomasz Urbanek[1], Antoni Wala[2], Henryk Bursig[3], Krzysztof Ziaja[1], Wacław Kuczmik[1]

[1]Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice (Department of General and Vascular Surgery Silesian Medical Academy, Katowice, Poland)

[2]Instytut Fizyki i Chemii Metali — Wydział Techniki Uniwersytetu Śląskiego, Katowice (Institute of Metal Physics and Chemistry, Facultuy of Engineering, University of Silesia, Katowice, Poland)

[3]Bank Tkanek Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, Katowice (Tissue Bank of Regional Blood Center, Katowice, Poland)

Streszczenie

Wstęp: W pracy oceniono właściwości mechaniczne allogenicznych tętnic ludzkich poddanych procesowi wyjałowienia w kąpieli antybiotykowej oraz procesowi kontrolowanego zamrażania przy wykorzystaniu 10-procentowego DMSO jako krioprotektora.

Materiał i metody: Badaniu poddano 12 aort i 9 tętnic udowych, wiek dawców wynosił 18–42 lata, czas przechowywania w parach ciekłego azotu — 1–36 miesięcy. Tętnice badano w próbie rozciągania, wykorzystując aparaturę pomiarową INSTRON oraz układ ciśnieniowy z manometrem. Każdorazowo oceniano wytrzymałość na rozciąganie oraz wartości modułu elastyczności przy naprężeniu równym 300 kPa oraz przy maksymalnymi naprężeniu. Wyniki porównano z wynikami uzyskanymi w obrębie naczyń niepoddanych mrożeniu.

Wyniki: W badanych rozmrożonych preparatach allograftu aorty ludzkiej wytrzymałość na rozciąganie w kierunku prostopadłym do długiej osi naczynia wyniosła 1,5 MPa (± 0,34), wzdłuż osi długiej — 1,05 MPa (± 0,3). Odpowiednie wartości dla tętnic udowych wyniosły 2,4 MPa (± 0,93) i 1,35 MPa (± 0,5). Wartości modułu sprężystości dla wycinków aorty przy naprężeniu równym 300 kPa wyniosły odpowiednio: 1,38 (± 0,4) i 1,8 (± 0,85), a dla tętnic udowych — 2,83 (± 1,34) i 1,47 (± 0,9). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między wynikami uzyskanymi w grupie badanej w stosunku do uzyskanych w grupie allograftów aortalnych przed poddaniem procesowi preparatyki i zamrożenia.

Wnioski: 1. Mrożone tętnice allogeniczne charakteryzują się dużą wytrzymałością mechaniczną na rozciąganie oraz ciśnienie w świetle naczynia. 2. Pomimo czynności wykonywanych w trakcie preparatyki naczynia po rozmrożeniu zachowują własności elastyczne porównywalne z własnościami naczyń, których nie poddano zamrożeniu. 3. Stosowanie tętnic z jak najmniejszą liczbą bocznic oraz dokładne zaopatrzenie ich ujść pozwala zwiększyć wytrzymałość allograftów tętniczych.

Słowa kluczowe: homograft, krioprezerwacja, właściwości mechaniczne, wytrzymałość, chirurgia naczyń, aorta, tętnica udowa

Abstract

Background: Assessment of the mechanical properties of human arteries after cryopreservation processing protocol including antibiotic sterilisation and controlled freezing with the use of cryoprotector (10% DMSO).

Material and methods: 12 aortic and 9 femoral artery segments were investigated; the donor age ranged from 18 to 42 years, the time of the storage in the liquid nitrogen vapours was from 1 to 36 months. The stretching tests of vessel specimens (using INSTRON tensile testing machine) and manometric investigations were performed. The mechanical resistance (breaking stress) and elastic moduli were evaluated (at maximal stress value and at the stress of 300 kPa). The results were compared with fresh homograft specimens.

Results: The mechanical resistance (breaking stress) of the investigated cryopreserved aortic segments ranged from 1.5 MPa (± 0.34) (if stretched perpendicular to the vessel long axis) to 1.05 MPa (± 0.3) (if stretching was performed in parallel). For the femoral artery specimens the respective values were 2.4 MPa (± 0.93) and 1.35 MPa (± 0.5). Elastic moduli at the stress of 300 kPa in aortic specimens achieved 1.38 (± 0.4) and 1.8 (± 0.85). For the attained femoral arteries respective values were 2.83 (± 1.34) and 1.47 (± 0.9). There were no significant differences concerning mechanical properties between fresh and cryopreserved aortic wall segments.
Conclusions: 1. Cryopreserved allogenic arteries (aorta, femoral arteries) maintain high mechanical resistance against breaking stress and intra-arterial pressure. 2. Despite vessel preparation (including sterilisation and control freezing protocols), cryopreserved arteries maintain elastic properties, justifying an implementation of this material in human circulatory system. 3. The use of arterial segments with low number of collaterals and their correct suture or ligation can influence the allograft mechanical stress resistance.

Key words: homograft, cryopreservation, mechanical proprieties, tensil strength, vascular surgery, aorta, femoral artery

Wstęp

Allogeniczne naczynia tętnicze i żylne wykorzystuje się obecnie w leczeniu niektórych wad wrodzonych oraz powikłań po operacjach naczyniowych. Ich duża oporność na reinfekcję oraz możliwość wszczepienia w zakażone środowisko skłania do wykorzystania takich naczyń do odtworzenia krążenia w przypadku infekcji [1–3]. Proces preparatyki, w tym sterylizacja, mrożenie a następnie rozmrożenie mogą wpływać na osłabienie ściany naczyń oraz jej własności elastyczne poprzez uszkodzenie ciągłości włókien sprężystych ściany naczynia lub też osłabienie ich wytrzymałości [4–9]. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny wytrzymałości ludzkich mrożonych przeszczepów tętniczych pod kątem ich bezpiecznego wykorzystania w chirurgii rekonstrukcyjnej układu naczyniowego.

Materiał i metody

Badaniu poddano fragmenty aorty oraz tętnic udowych poddane wcześniejszemu procesowi preparatyki w Banku Tkanek Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach. Naczynia uzyskiwano w trakcie pobrania wielonarządowego — pobierano aortę w odcinku podnerkowym, tętnice biodrowe oraz udowe. Wiek dawców wynosił 18–42 lat. Do badania nie kwalifikowano dawców, u których stwierdzano jakiekolwiek widoczne makroskopowo zmiany miażdżycowe. Każdorazowo po dostarczeniu naczynia do Banku Tkanek tętnice wyjaławiano w kąpieli antybiotykowej zawierającej medium RPMI i surowicę płodową cielęcą. W następnym etapie preparat zamrażano przy użyciu 10-procentowego dimetylosulfotlenku (DMSO, *dimethyl sulfoxide*) jako krioprotektora za pomocą urządzenia do kontrolowanego zamrażania tkanek. Po zamrożeniu tętnice przechowywano w parach ciekłego azotu (czas przechowywania — 1–36 miesięcy). Badaniu poddano 12 aort oraz 9 tętnic udowych. Natychmiast po rozmrożeniu (według opracowanego schematu rozmrażania — każdorazowo przy zachowaniu stałych warunków rozmrażania) naczynia poddawano badaniu wytrzymałościowemu. Wyniki porównano z wartościami uzyskanymi z badania wykonanego na fragmentach naczyń grupy kontrolnej — przed zamrożeniem.

Introduction

Arterial and venous allografts are currently used in the treatment of some congenital malformations or complications after vascular procedures. A high resistance against reinfection justifies the implementation of homografts in the vascular reconstructive procedures in the infected field [1–3]. Due to a possible elastic fibre disruption or decrease in their resistance, the process of allograft preparation, including sterilisation, freezing and thawing, can influence the vessel wall resistance and its elastic proprieties [4–9]. To assess the usefulness and safety of the cryopreserved homografts in the vascular reconstructive surgery, the mechanical proprieties of these arteries were investigated in the paper.

Material and methods

Human cryopreserved aortas and femoral arteries were investigated. The allografts were processed at the Tissue Bank of the Regional Blood Centre in Katowice after procurement from multi-organ donors (usually as a unique aorto-femoral graft consisting of subrenal aorta, iliac and femoral arteries). The donor age ranged from 18 to 42 years. All vessels with macroscopically seen atherosclerotic changes were excluded. Before controlled freezing the vessels were sterilised in the antibiotic batch containing: RPMI medium, foetal calf serum and antibiotic solution. In the next step a controlled freezing using cryoprotector (10% DMSO, *dimethyl sulfoxide*) was performed and the arteries were stored at the liquid nitrogen vapour temperature from 1 to 36 months. 12 aortic segments and 9 femoral arteries were investigated. The assessment of the mechanical proprieties was performed immediately after thawing — the results were compared with control unfrozen vessels.

Mechanical testing — specimen preparation

1-cm-wide vessel wall specimens (rings) were obtained from the aorta above the bifurcation and from the femoral artery above the ostium of the deep femoral artery (each time a few-cm-long vessel segments were shipped from

Badanie wytrzymałościowe — przygotowanie preparatów

Badaniu poddano odcinki aorty centymetrowej szerokości oraz odcinki tętnicy udowej wspólnej tej samej szerokości. (Każdorazowo do badania dostarczano kilkucentymetrowy odcinek aorty i tętnicy udowej, a następnie wycinano pierścień z tego samego odcinka aorty oraz drugi — z tętnicy udowej — na wysokości tuż powyżej odejścia udowej wspólnej). Do badania przeznaczono fragmenty niezawierające ujść bocznic. Pierścień naczynia rozcinano i badano, przykładając siłę rozciągającą wzdłuż przebiegu włókien (poprzecznie do długiej osi naczynia).

Dodatkowo z pozostałego materiału wycinano paski centymetrowej szerokości (z aorty powyżej rozwidlenia oraz z tętnicy udowej powyżej ujścia tętnicy głębokiej uda). Te fragmenty naczyń badano, rozciągając je w ich długiej osi. W przypadkach, w których udało się uzyskać co najmniej 2-centymetrowy odcinek aorty lub tętnicy udowej z danego preparatu, wykonywano badanie wytrzymałości na ciśnienie płynu działające od światła naczynia (wyróżniono naczynia, w których badany odcinek nie posiadał bocznic oraz naczynia z bocznicami, które zaopatrzono — podwiązano) — opis badania poniżej.

I. Badanie wytrzymałościowe w próbie rozciągania

Badanie wytrzymałości w próbie rozciągania wykonano za pomocą aparatu INSTRON 1195, stosując zakres pomiarowy 50 N oraz prędkość rozciągania równą 10 mm/min. Wycięte (według metodyki — jak powyżej) paski naczynia poddawano rozciąganiu po wcześniejszym ufiksowaniu końców preparatu w specjalnie przystosowanych zaciskach. Mierzono odległość zacisków oraz grubość naczynia, a następnie rozciągano wzdłuż badanego wycinka naczynia (badaniu poddano dwa preparaty z każdego naczynia — rozciągając je poprzecznie lub wzdłuż długiej osi naczynia — według metodyki powyżej). Wyniki rejestrowano w formie wykresów, które następnie poddano analizie.

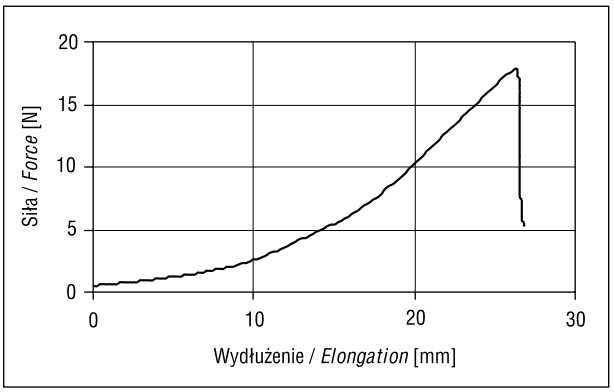
II. Badanie wytrzymałościowe w próbie ciśnieniowej

Odcinek naczynia umieszczano w układzie pomiarowym zawierającym manometr. Jeden koniec naczynia zamykano korkiem ze stali kwasoopornej o średnicy odpowiadającej średnicy naczynia, a drugi mocowano do trójnika, do którego podłączony był manometr i dren, którym podawano płyn pod wzrastającym ciśnieniem. W momencie pęknięcia naczynia, widocznego makroskopowo, rejestrowano maksymalną wartość ciśnienia.

Badane parametry

W trakcie rozciągania odcinków aort i tętnic udowych z prędkością 10 mm/min rejestrowano wartości siły i wydłużenia. Przykładowy wykres rozciągania odcinka aorty przedstawiono na rycinie 1.

Z uzyskanych danych sporządzano wykresy zależności naprężenia nominalnego σ ($\sigma = F/S_0$, gdzie: F — siła, S_0 — przekrój poprzeczny odcinka naczynia) od wydłużenia jednostkowego ε ($\varepsilon = \Delta L/L_0$, gdzie: L_0 — długość początkowa, ΔL — wydłużenie całkowite) i wyznaczano wytrzyma-



Rycina 1. Krzywa rozciągania aorty
Figure 1. Aortic stretching curve

the Tissue Bank for this investigation). After dissection of the procured rings, 1-cm-wide strips of the vessels were ready for stretching in the testing machine.

From the remaining material of the same aortic or femoral artery segment — 1-cm-wide strips (avoiding collaterals) were dissected along the long axis of the vessel wall. In the cases where > 2-cm-long segments of the vessel were available, a manometric investigation was performed (see description below).

I. Mechanical resistance testing — elongation test

An INSTRON 1195 testing machine was used (measuring range — 50 N, stretching velocity 10 mm/min). After fixation of the tissue in specially designed and prepared clamps, the distance between the clamps as well as vessel wall thickness were measured and stretching was performed. From each vascular segment two strips were investigated. The stretching (always along previously dissected wall strip) was performed perpendicular to the long vessel axis or along the vessel — the stress/ /strain direction depended on the way of specimen dissection from the aorta or femoral artery (according to the above-mentioned method).

II. Mechanical resistance testing — manometric investigation

The segment of the vessel was placed in the manometric system. One stump of the vessel was closed by an acid-proof steel occluder, another side was connected with the T-joint with the manometer and drain, filling the system with liquid under slowly increasing pressure. The maximal pressure, at the moment of vessel rupture, was registered. A group of vessels with and without collaterals was present (if collaterals were present, all these vessels were tied and, if this was impossible, their ostium was sutured using vascular suture).

Parameter evaluation

During stretching of the aortic and femoral artery specimens the force and elongation were registered in the software of the INSTRON tenisle testing machine. An example of the aortic wall stretching is presented in Figure 1.

łość na rozciąganie — R_m, moduł elastyczności — E, podatność — P oraz względne wydłużenie procentowe — $\varepsilon_{(\%)}$[10]. Wytrzymałość na rozciąganie wyliczano ze wzoru:

$$R_m = \frac{F_m}{S_0} \text{ [MPa]}$$

gdzie: F_m — siła maksymalna,
S_0 — przekrój poprzeczny odcinka naczynia.

Za moduł elastyczności (E) przyjęto maksymalną wartość tangensa kąta nachylenia krzywej naprężenia σ od wydłużenia jednostkowego ε

$$E = \Delta\sigma/\Delta\varepsilon$$

Dodatkowo wyliczano wartości modułu elastyczności przy wartości naprężenia 300 kPa.

Sposób wyznaczania modułu elastyczności przedstawiono schematycznie na rycinie 2.

Podatność ścian naczynia (P), która określa wartość elastycznego wydłużenia procentowego do naprężenia, wyznaczono ze wzoru:

$$P = 1/E$$

Za względne wydłużenie procentowe przyjęto wartość odkształcenia elastycznego wyliczonego ze wzoru:

$$\varepsilon_{(\%)} = R_m/E100\%$$

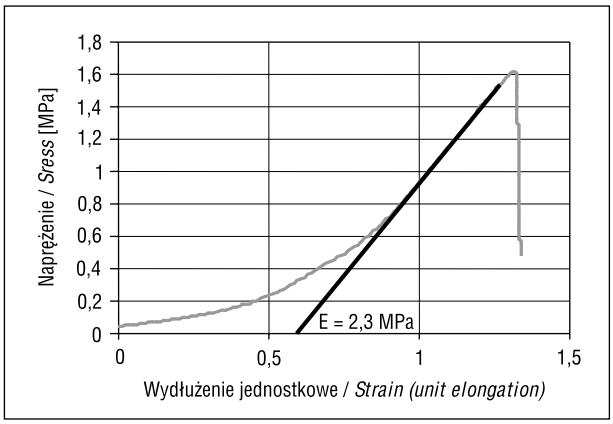
Zmierzone ciśnienie, wywołujące rozerwanie naczynia, posłużyło do wyznaczenia wartości naprężenia nominalnego, które wyliczano ze wzoru:

$$\sigma_{\text{rozryw.}} = \frac{p\,(d + g)}{2g}$$

gdzie: d — średnica wewnętrzna naczynia,
g — grubość ścianki naczynia,
p — ciśnienie.

Wyniki

Wyniki pomiarów zapisano w formie wykresów wykonanych w programie obsługującym funkcje pomiaro-



Rycina 2. Wykres naprężenia w zależności od wydłużenia jednostkowego. Sposób wyliczenia modułu elastyczności
Figure 2. Aortic wall stress in relation to unit elongation. The way of elastic modulus calculation

The data were registered and transformed to stress/ /strain curves based on the thickness of the specimens and their diameter.

In the first step, nominal stress σ ($\sigma = F/S_0$, F – force, S_0 — vessel cross — sectioned area) versus strain (unit elongation — ε) curve was analysed ($\varepsilon = \Delta L/L_0$, L_0 — initial length, ΔL — total elongation) and the mechanical resistance (breaking stress) — R_m, elastic modulus — E, compliance — P and proportional elongation — $\varepsilon_{(\%)}$ were calculated [10]. Mechanical resistance was calculated according to the formula:

$$R_m = \frac{F_m}{S_0} \text{ [MPa]}$$

where: F_m — maximal force,
S_0 — cross-sectioned area.

The elastic modulus was evaluated as the slope of a stress curve σ (maximum tangent value of the stress curve in relation to unit elongation — ε)

$$E = \Delta\sigma/\Delta\varepsilon$$

Additionally, an elastic modulus at the point of 300 kPa stress was calculated.

The way of evaluating the elastic modulus is schematically shown in Figure 2.

The compliance — P (describing the relation between elastic proportional elongation and applied stress) was calculated as follows:

$$P = 1/E$$

[E — elastic modulus]

The relative proportional elongation value was calculated according to the formula

$$\varepsilon_{(\%)} = R_m/E100\%$$

and breaking stress value in the manometric examination was found from the relation:

$$\sigma_{\text{break}} = \frac{p\,(d + g)}{2g}$$

d — diameter of vessel internal lumen
g — thickness of the vessel wall
p — pressure.

Results

The measurement results were stored and analysed using a software analyser. The results concerning the mechanical resistance and elastic properties of examined vessels are presented in the Tables I, IIa, IIb, IIIa, IIIb.

Among the investigated aortic segments, in the manometric system the mean breaking stress value attained 0.66 MPa (ranging from 0.31 to 0.93, standard deviation — 0.18) for the vessels with collaterals. In one case, where the aortic segment without collaterals was available, the registered value was 1.02 MPa. In the femoral arteries the range from 0.31 to 1.02 MPa (mean 0.71 MPa) was reported.

we aparatu INSTRON. Na postawie analizy wykresów oraz uzyskanych danych dotyczących badanych tętnic wyznaczono opisane wcześniej parametry. Uzyskane wyniki dotyczące wytrzymałości oraz parametrów sprężystości przedstawiono w tabelach I, IIa, IIb, IIIa, IIIb.

W badanych preparatach aorty w układzie manometrycznym średnia wartość naprężenia rozrywającego w przypadku naczyń z bocznicami zaopatrzonymi szwem wyniosła 0,66 MPa (0,31–0,93; odchylenie standardowe — 0,18). W jednym przypadku fragmentu aorty pozbawionego ujść bocznic naprężenie rozrywające wyniosło 1,02 MPa. W obrębie tętnic udowych badanych w układzie manometrycznym średnia wartość naprężenia rozrywającego wyniosła 0,71 MPa (0,31–1,02).

Wartości uzyskane w obrębie badanych wycinków aorty w obrębie naczyń stanowiących grupę kontrolną (naczynia przed poddaniem zamrożeniu) przedstawiają tabele IIIa oraz IIIb.

Oceniając wytrzymałość na rozciąganie wycinków aort ludzkich poddanych krioprezerwacji stwierdzono, że do zerwania ściany naczynia dochodzi przy naprężeniu o wartości w przedziale 0,97–2,09 MPa (średnio — 1,5 MPa).

The results of test performed on control vessels (arteries before preparation and freezing are shown in Tables IIIa and IIIb.

In the thawed (and previously cryopreserved) aortic specimens, vessel wall breaking occurred at the stress from 0.97 to 2.09 MPa (mean — 1.5 MPa). If the stretching was performed along the axis of the vessel, the respective values ranged from 0.45 — 1.16 (mean — 1.05 MPa). All these results significantly exceeded the normal physiological values observed within the human body. The observed vessel wall continuity disruption occurred mostly in the region of collateral openings and that is why the ostium of such a vessel (collateral vessel) is considered an important point that could decrease graft mechanical resistance. This was confirmed especially in manometric investigation — despite the proper ligation of collaterals or their suture, the incompetence was usually observed in the collateral ostium region. In the aortic segments with collaterals the reported maximum pressure was 0.6 MPa (ranging from 0.31 to 0.93 MPa) and a rupture was always observed around a ligated or sutured ostium of one of the collaterals. In the aortic segment

Tabela I. Badanie wytrzymałości w próbie rozciągania aorty i tętnicy udowej (aorta — preparaty 1–12, tętnica udowa — preparaty 1–9)
Table I. Mechanical resistance (stretching test): aortic specimens 1–12, femoral artery specimens: 1–9

	Aorta 1–12		Tętnica udowa 1–9 *Femoral artery* 1–9	
	Rm-pop. [MPa]	Rm-wzdł. [MPa]	Rm-pop. [MPa]	Rm-wzdł. [MPa]
Wartość średnia / *Mean value*	1,50325	1,05533	2,41133	1,35266
Odchylenie standardowe / *Standard deviation*	0,34082	0,30864	0,93184	0,57154

Rm — wytrzymałość na rozciąganie, *mechanical resistance (breaking stress)*; Rm-pop.— wytrzymałość na rozciąganiu poprzecznie do długiej osi naczynia (rozciąganie paska naczynia wyciągniętego z obwodu naczynia), *mechanical resistance (breaking stress) — stretching performed perpendicular to the long vessel axis*; Rm-wzdł. — wytrzymałość na rozciąganie przy rozciąganiu wzdłuż długiej osi naczynia (rozciąganie paska naczynia wyciętego w formie prostokątnego odcinka wzdłuż jego osi), *mechanical resistance (breaking stress) — stretching performed along the long vessel axis*

Tabela IIa. Wyniki uzyskane w próbie rozciągania aorty (preparaty 1–12)
Table IIa. Aortic specimens 1–12 — stretching test results

	E-pop. [MPa]	E-wzdł. [MPa]	1/E100%-pop. [%/MPa]	1/E100%- wzdł. [%/MPa]	ε100%-poprz. [%]	ε100%-wzdł. [%]	E_{300kPa}-pop. [MPa]	E_{300kPa}-wzdł. [MPa]
Wartość średnia / *Mean value*	3,82	3,73	27,70	31,08	41,17	30,17	1,38	1,81
Odchylenie standardowe / *Standard deviation*	0,91	1,42	7,09	14,17	13,09	8,81	0,40	0,85

Tabela IIb. Wyniki uzyskane w próbie rozciągania tętnic udowych (preparaty 1–9)
Table IIb. Femoral artery specimens 1–9 — stretching test results

	E-pop. [MPa]	E-wzdł. [MPa]	1/E100% [%/MPa]	1/E100% [%/MPa]	ε100% [%]	ε100% [%]	E_{300kPa}-pop. [MPa]	E_{300kPa} -wzdł. [MPa]
Wartość średnia / *Mean value*	7,62	3,32	0,21	0,49	43,24	48,66	2,83	1,47
Odchylenie standardowe / *Standard deviation*	5,03	2,35	0,15	0,46	24,28	17,64	1,34	0,90

E-pop. — moduł elastyczności przy maksymalnym naprężeniu — rozciąganie poprzecznie do długiej osi naczynia, *elastic modulus at maximum stress value — the specimens stretched perpendicular to the long vessel axis*; E-wzdł. — moduł elastyczności przy maksymalnym naprężeniu — rozciąganie w kierunku osi długiej naczynia, *elastic modulus at maximum stress value — the specimens stretched along the vessel axis*; 1/E100% — podatność, *compliance*; ε100% — względne wydłużenie procentowe, *relative proportional elongation*; E_{300kPa}-pop. — moduł elastyczności przy naprężeniu równym 300kPa — rozciąganie poprzecznie do długiej osi naczynia, *elastic modulus at a stress of 300 kPa — the specimens stretched perpendicular to the long vessel axis*; E_{300kPa}-wzdł. — moduł elastyczności przy naprężeniu równym 300 kPa — rozciąganie w kierunku osi długiej naczynia, *elastic modulus at a stress of 300 kPa — the specimens stretched along the vessel axis*

Tabela IIIa. Wyniki uzyskane w próbie rozciągania aorty w grupie kontrolnej
Table IIIa. Control group stretching results — aorta

	Rm-pop. [MPa]	Rm-wzdl. [MPa]	E-pop. [MPa]	E-wzdl. [MPa]
Wartość średnia / *Mean value*	1,56	1,65	2,42	3,80
Odchylenie standardowe / *Standard deviation*	0,72	0,92	1,43	3,08

Tabela IIIa. Wyniki uzyskane w próbie rozciągania aorty w grupie kontrolnej
Table IIIb. Control group stretching results — aorta

	1/E100% [%/MPa]	1/E100% [%/MPa]	ε100% [%]	ε100% [%]	E_{300kPa}-pop. [MPa]	E_{300kPa}-wzdl. [MPa]
Wartość średnia / *Mean value*	0,55	0,37	77,62	49,00	1,26	2,35
Odchylenie standardowe / *Standard deviation*	0,34	0,18	43,03	11,19	0,25	0,36

Przy sile przyłożonej wzdłuż długiej osi naczynia, a więc poprzecznie do przebiegu włókien błony środkowej, zerwanie następowało przy wartości średniej wynoszącej 1,05 MPa (0,45–1,16 MPa). Zakres powyższych wartości znacznie przekracza wartości ciśnienia spotykanego fizjologicznie w układzie naczyniowym człowieka. Ze względu na brak ciągłości ściany naczynia wynikający z występowania bocznic ich ujścia należy uznać za miejsca o obniżonej wytrzymałości, co wykazało badanie w układzie ciśnieniowym. Pomimo dokładnego zaopatrzenia ujść naczyń tętniczych (bocznic aorty) szwem naczyniowym lub grubą nieprzecinającą ściany podwiązką, do przerwania ciągłości naczynia dochodziło w miejscu występującego ujścia. W przypadku odcinka naczynia (aorta) z bocznicami średnie maksymalne ciśnienie wyniosło 0,6 MPa (0,31–0,93 MPa) — zerwanie ściany każdorazowo dotyczyło fragmentu zawierającego bocznicę. W przypadku jednego naczynia (aorta) w którym udało się uzyskać wystarczająco długi odcinek bez bocznic, maksymalne ciśnienie w świetle naczynia osiągnęło wartość 1,02 MPa.

Kolejnym zagadnieniem ocenianym w przeprowadzonym badaniu było zachowanie własności elastycznych decydujących o przenoszeniu fali tętna na obwód i zachowanie naczynia po wszczepieniu w układ naczyniowy, a więc także — ryzyko ewentualnej zakrzepicy przeszczepu i obwodowego łożyska naczyniowego. Naczynie poddawane kilkudziesięciu cyklom fali tętna w ciągu minuty musi charakteryzować się odpowiednimi parametrami sprężystymi, o czym decydują głównie elementy elastyczne błony środkowej aorty. Wyliczony dla ściany aorty średni moduł elastyczności, będący wartością tangensa kąta nachylenia krzywej naprężenia do wydłużenia jednostkowego, wyniósł 3,82 — wartość ta nie odnosi się jednak ściśle do parametrów pracy naczynia u człowieka, ponieważ wyliczono ją z wartości maksymalnego naprężenia tuż przed zerwaniem naczynia dla warunków stworzonych w badaniu. Przyjmując bardziej fizjologiczną granicę naprężenia — 300 kPa — odpowiednie wartości modułu elastyczności wyniosły 1,38 dla wycinków naczynia badanych zgodnie z przebiegiem włókien błony środkowej oraz 1,8 dla wycinków badanych zgodnie z długą osią naczynia (średnie wydłużenie przy naprężeniu 300 kPa wyniosło odpowiednio: 41% i 30%).

without collaterals (sufficiently long to perform this kind of investigation — 1 vessel) — maximum pressure achieved 1.02 MPa.

Besides the mechanical stress resistance of the investigated vessels, elastic properties after thawing of cryopreserved arteries are also of great importance. These proprieties seem to be the decisive factors for the proper pulse wave propagation in the arterial system maintaining physiological vessel functions and avoiding thrombosis of the graft and distal circulation. The vessels underwent continuous pulse pressure, which requires correct elastic properties ensured especially by elastic fibres of the medial layer in the aortic model. The mean aortic elastic modulus achieved 3.82 — however, this does not correlate with the conditions found in the human body because for this calculation the maximum stress/strain value was taken — just before vessel wall breaking. For more physiological range — 300 kPa, the respective values of the elastic modulus were 1.38 (vessel elongation vertically to the long axis) and 1.8 (stretching along the long vessel axis). The mean relative proportional elongation at 300 kPa was 41 and 30% respectively. Comparing the above-mentioned results with the group of control vessels (aortic segments before freezing and thawing) no statistical differences in the mechanical resistance and elastic moduli were found.

In the femoral artery segments satisfactory mechanical vessel behaviour was also noticed. During the mechanical stretching, the rupture of the artery wall (breaking stress) was reported at the stress of 2.4 MPa — from 1.58 to 3.17. For the strips of arteries strained along the long vessel axis the value achieved 1.35 MPa and in the manometric system 0.71 MPa was recorded (also in these cases the presence of collaterals turned out to be a decisive factor influencing an early vessel rupture). The respective values of elastic moduli were 7.62 MPa and 3.32 MPa for maximum strain or 2.83 MPa and 1.47 MPa at 300kPa.

There was no correlation found between the investigated mechanical properties and the durability of storage in liquid nitrogen vapours. There was also no correlation found between patients' age and mechanical resistance, however, there was a relation between patient age and elastic moduli.

Porównując uzyskane wyniki z wynikami grupy kontrolnej preparatów aorty przed sterylizacją i zamrożeniem, badanymi według tej samej metody, nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w zakresie wytrzymałości, a także wyliczonych modułów elastyczności.

Podobnie jak w zakresie omówionych powyżej wycinków aort poddanych kontrolowanemu mrożeniu w przypadku mrożonych tętnic udowych ludzkich uzyskano wysokie parametry wytrzymałości mechanicznej. Dla wycinków tętnic udowych poddanych rozciąganiu wartości wytrzymałości na rozciągnie wyniosły średnio 2,4 MPa (1,58–3,17) w przypadku siły działającej prostopadle do osi długiej naczynia. Dla tętnic rozciąganych równolegle do osi długiej średnia wartość wyniosła 1,35, a dla badania w układzie manometrycznym — do 0,71 MPa (podobnie jak w przypadku aorty, pęknięcia ściany w układzie manometrycznym obserwowano w miejscu ujścia bocznic). Odpowiednie wartości modułu elastyczności przy sile działającej w poprzek i wzdłuż osi długiej naczynia wyniosły dla tętnic udowych 7,62 i 3,32 MPa (przy wartości maksymalnej siły zrywającej) oraz 2,83 i 1,47 MPa przy naprężeniu 300 kPa.

Analizując wpływ okresu przechowywania, nie stwierdzono zależności statystycznej między wytrzymałością i modułem sprężystości przy naprężeniu 300 kPa a długością okresu przechowywania. Także wiek dawcy nie miał wpływu na wytrzymałość, stwierdzono jednak zależność między wiekiem a wyliczonym modułem sprężystości.

Dyskusja

Jak wykazano w przeprowadzanym badaniu, proces preparatyki pozwala uzyskać naczynia o zachowanych właściwościach elastycznych oraz wytrzymałości mechanicznej umożliwiających bezpieczne stosowanie tego typu przeszczepów w warunkach układu naczyniowego człowieka (również z zakresie ciśnień znacznie przekraczających wartości fizjologiczne). Problemem, na który należy zwrócić szczególną uwagę, jest obecność bocznic i ich ujść. W trakcie przygotowania do wszczepienia miejsca te zaopatruje się szwem naczyniowym lub podwiązuje. To jednak właśnie w ich obrębie może dochodzić najczęściej do pęknięć, co wywołane jest zarówno panującym w świetle naczynia ciśnieniem, jak również możliwością uszkodzenia delikatnej ściany naczynia przez zawiązywaną podwiązkę. Drugim miejscem o podobnej wrażliwości na urazy jest okolica zespoleń. Zespolenia naczyniowe wykonuje się najczęściej szwem ciągłym. Zarówno przeciąganie szwu przez otwór po wkłuciu igły, jak i rozcięcie czy też rozerwanie ściany przez igłę mogą być przyczyną późniejszych powikłań. W literaturze dotyczącej wszczepienia allogenicznych naczyń wczesne pęknięcia naczyń (najczęściej jako powikłania śmiertelne — *graft-related death*) dotyczą 4–10% operowanych [1, 2, 4, 11]. Dlatego tak ważna wydaje się odpowiednia kontrola i kwalifikacja wszczepianych naczyń. Do osłabienia ściany może dojść zarówno w miejscu istnienia blaszki miażdżycowej, jak i krwiaka w ścianie naczynia. Po zamrożeniu, a następnie rozmrożeniu, miejsca te staną

Discussion

The performed investigation confirmed that proper preparation and cryopreservation made it possible to preserve the homograft elastic properties and also mechanical resistance, justifying the use of such a graft in the human vascular system (also in pressure ranges higher than in physiological conditions). Special attention should be paid to the presence of collaterals and their openings. Although before implantation these places are usually sutured or tied, they still remain points of a significantly lower resistance (especially if the possibility of wall destruction due to vascular suture or ligature is taken into consideration). Such an injury in the presence of high intraarterial pressure can be the origin of the wall rupture and of dangerous complications.

Another characteristic place with a relatively high risk of rupture is the peri-anastomotic graft region. The vascular anastomosis is usually performed using a continuous one — layer suture. A disruption of the very soft allograft wall by a needle or suture can lead to anastomosis dehiscence and bleeding. According to the literature, early graft-related death is reported in 4–10% of implanted cases [1, 2, 4, 11]. To decrease this number all negative factors should be excluded and that is why a proper control and qualification of the harvested vessels seems to be one of the principal rules considering these procedures (together with a proper intraoperative technique of allograft suture). The mechanical defect of the allograft wall can also occur due to the presence of atherosclerotic plaques or intramural haematoma. After freezing and thawing, in these places a mechanical wall disruption can occur. Another problem concerns an allograft injury during previous treatment of the patient (before the death of the brain is recognised) or injuries during vessel procurement — such an artery destruction can disqualify allogenic vessels from further processing steps at the Tissue Bank.

After thawing, the cryopreserved arteries maintain elastic properties similar to unfrozen vessels which allows us to achieve proper peripheral pulse propagation and convenient haemodynamic conditions, similar to physiological ones [8, 12, 13]. According to the literature, the significant changes concern homografts in the late period after implantation. Due to the chronic immunological reaction and destructive changes, the vessel wall rebuilding occurs, which influences the wall structure and mechanical properties [1, 6, 14–16]. This can result in slowly progressing dilatation (including false aneurysm development) or stenosis (due to vessel wall thickening, especially within internal or medial layer) leading to the graft occlusion. The changes described above usually concern the vessels many months or years after the reconstructive surgery. However, the length of this time interval can give the patient and the surgeon a chance and time for the next vascular procedure after successful infection treatment (still remaining one of the principal indications for homograft implantation).

się okolicami zmniejszonej wytrzymałości wynikającej z mechanicznego uszkodzenia ściany w trakcie mrożenia. Osobnym problemem są rozerwania w trakcie pobierania lub też wcześniejszej opieki nad dawcą — tego typu urazy są wskazaniem do dyskwalifikacji całości lub też części przeszczepu w dalszych etapach preparatyki.

Badane naczynia allogeniczne po rozmrożeniu zachowują własności elastyczne zbliżone do naczyń niemrożonych, co zapewnia odpowiednie przenoszenie fali tętna na obwód, a tym samym — korzystne warunki hemodynamiczne, podobne do występujących fizjologicznie w organizmie człowieka [8, 12, 13]. Znacznie większe zmiany występują w okresie późniejszym po wszczepieniu. Jak wynika z piśmiennictwa, wskutek przewlekłych reakcji immunologicznych oraz zmian zwyrodnieniowych naczynie ulega stopniowej przebudowie, co zmienia istotnie strukturę, a zatem i właściwości mechaniczne jego ściany [1, 6, 14–16]. Może to prowadzić do postępującego poszerzenia (w tym także powstania tętniaków rzekomych), jak również do zwężeń powodowanych pogrubieniem ściany, zwłaszcza w obrębie błony wewnętrznej i środkowej naczynia, a w konsekwencji — do zatkania przeszczepu. Zmiany te rozwijają się jednak na przestrzeni miesięcy i lat po wykonanej operacji rekonstrukcyjnej, co pozwala na ewentualną ponowną rekonstrukcję po wyleczeniu infekcji będącej w danej chwili głównym wskazaniem do implantacji badanych naczyń.

Wnioski

1. Mrożone tętnice allogeniczne (aorta, tętnice udowe) charakteryzują się dużą wytrzymałością mechaniczną na rozciąganie oraz ciśnienie w świetle naczynia.
2. Pomimo czynności wykonywanych w trakcie preparatyki (w tym — sterylizacji antybiotykowej i mrożenia) naczynia po rozmrożeniu zachowują własności elastyczne umożliwiające wykorzystanie ich w układzie naczyniowym człowieka.
3. Stosowanie tętnic z jak najmniejszą liczbą bocznic oraz dokładne zaopatrzenie ich ujść pozwala zwiększyć wytrzymałość allograftów tętniczych.

Praca zrealizowana w ramach projektu celowego KBN nr 4 PO5C 012 98 C/4069

Piśmiennictwo (References)

1. Kieffer E., Bahnini A., Koskas F. i wsp. In situ allograft replacement of infected infrarenal aortic prosthetic grafts: results in forty three patients. J. Vasc. Surg. 1993; 17: 349–355.
2. Desgranges P., Beaujan F., Brunet S. i wsp. Cryopreserved arterial allografts used for the treatment of infected vascular grafts. Ann. Vasc. Surg. 1998; 12: 583–588.
3. Ziaja K., Urbanek T., Bursig H.M. i wsp. Homograft w leczeniu infekcji protez naczyniowych. Pol. Przeg. Chir. 1998; 70 (9): 920–929.
4. Lahalle B., Geschier C., Fieve G. i wsp. Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts. J. Vasc. Surg. 1998; 27: 189–190.

Conclusions

1. Cryopreserved allogenic arteries (aorta, femoral arteries) maintain high mechanical resistance against breaking stress and intra-arterial pressure.
2. Despite vessel preparation (including sterilisation and control freezing protocols), cryopreserved arteries maintain elastic properties, justifying an implementation of this material in the human circulatory system.
3. The use of arterial segments with a low number of collaterals and their correct suture or ligation can influence the allograft mechanical stress resistance.

The investigation was supported by KBN project no. 4 PO5C 012 98 C/4069

5. Vogt P.R., Zund G., Lachat M. i wsp. Regarding „Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts". J. Vasc. Surg. 1997; 25: 751–752.
6. Christie G.W., Barratt-Boyes B.G. Identification of a failure mode of the antibiotic sterilized aortic allograft after 10 years; implications for their long term survival. J. Card. Surg. 1991; 6: 462–467.
7. Armiger L.C., Thomon R.W., Srickett M.G., Barratt-Boyes B.G. Morphology of heart valves preserved by liquid nitrogen freezing. Thorax 1985; 40: 778–780.
8. Langerak S.E., Groenik M., van der Wall E.E. i wsp. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. Transpl. Int. 2001; 14: 248–255.
9. Livi U., Abdulla A.K., Parker R. i wsp. Viability and morphology of aortic and pulmonary homografts. A comperative study. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1987; 93: 755–760.
10. Wala A. Metody badań materiałów. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice 1995.
11. Vogt P.R., Brunner-La Rocca H.P., Lachat M. i wsp. Technical details with the use of cruopreserved arterial allografts for aortic infection: influence on early and mid-term mortality. J. Vasc. Surg. 2002; 35: 80–86.
12. Pukacji F., Jankowski T., Gabriel M. i wsp. The mechanical proprieties of fresh and cryopreserved arterial homografts. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2000; 20: 21–24.
13. Vesley I., Gonzales-Lavin L., Graf D. i wsp. Machanical testing of cryopreserved aortic allografts. Comparison with xenografts and fresh tissue. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1990; 99: 19–23.
14. Vogt P.R., Stalmach T., Niederhauser U. i wsp. Explanted cryopreserved allografts: a morphological and immunohistochemical comparison between arterial allografts and allografts heart valves from infants and adults. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 1999; 15: 639–644.
15. Christie W., Barratt-Boyes B.G. Age-Dependent changes in the radial stretch of human aortic valve leaflets determined by biaxial testing. Ann. Thorac. Surg. 1995; 60: 156–159.
16. Christie G.W., Barratt-Boyes B.G. Biaxial mechanical properties of explanted aortic allograft leaflets. Ann. Thorac. Surg. 1995; 60: 160–164.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):
dr med. Tomasz Urbanek
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń Śląskiej Akademii Medycznej
ul. Ziołowa 45/47, 40–635 Katowice
tel./faks: (032) 202–95–77; e-mail: urbanek.tom@interia.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 20.07.2002 r.